



IVD

CE

PP - RIA

RB316

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo



en

Read entire protocol before use.

PP-RIA

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of pancreatic polypeptide (PP) in human serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource PP-RIA
- B. Catalog number : RB316 : 100 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

1. Biological activities

Pancreatic polypeptide (PP) is synthesized as an amino-terminal moiety of a precursor peptide. PP isolated from pancreas has 36 amino acid residues with an amidated C-terminal tyrosine. PP is secreted by F-cells of the islets of Langerhans. PP is localized almost entirely in the pancreas although detectable levels throughout gastrointestinal tract have been reported. PP in human plasma is reported to exist in at least four different forms:

PP 1-36, PP 3-36 and two unidentified forms.

PP is released into plasma during stimulation of meal. The physiological role of PP includes inhibition of stimulated gastric and pancreatic exocrine secretions and augmentation of insulin inhibited hepatic glucose production. These actions of PP are mediated by specific receptors. Receptor binding studies have shown that the intact C-terminal tyrosine amide is necessary for biological activity.

2. Clinical application

The secretion of PP is stimulated by meal especially protein and fat. PP is also produced by endocrine active tumours in the pancreas and the gastrointestinal tract. These tumours often produce several peptide hormones in the combinations PP-VIP, PP-glucagon or PP-gastrin. Tumours with only PP-secretion have been reported. These tumours may occur at the WDHA or Verner-Morrison syndrome.

Elevated fasting levels of PP in serum are found at the occurrence of PP-producing tumours and endocrine tumours in the pancreas and in the gastrointestinal tract.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The intended use of these reagents is for assay of PP in human serum. PP in serum is assayed without extraction by a competitive radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against bovine PP. PP in calibrators and samples compete with ^{125}I -labelled human PP in binding to the antibodies. ^{125}I -PP binds in a reverse proportion to the concentration of PP in calibrators and samples. Antibody-bound ^{125}I -PP is separated from the unbound fraction using the double antibody-polyethylene glycol precipitation technique. The radioactivity of the precipitates is measured. Human, synthetic PP is used for standardisation.

For professional use within a laboratory.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
[ANTISERUM] Rabbit antiserum raised against bovine PP. Contains phosphate buffer with human serum albumin and NaN_3 .	1 vial lyophilised	Blue	Add 52 mL distilled water
Ag ^{125}I TRACER: ^{125}I odine labelled PP in phosphate buffer with human serum albumin and NaN_3 . Contains normal rabbit serum	1 vial lyophilised 28 kBq	Red	Add 12.5 mL distilled water
[Ab] PEG Double Antibody-PEG: Goat anti-rabbit Ig antiserum in phosphate buffer with human serum albumin and sodium azide. (<0.1%). Contains polyethylene glycol	1 vial 50 mL	Green	Ready for use
[DIL] BUF Calibrator diluent: PP-free human serum lyophilised. Contains aprotinin. For preparation of PP-working calibrators.	1 vial lyophilised	Black	Add 10 mL distilled water
[ASS] BUF Assay buffer : phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide, (<0.1%). To be used instead of antiserum in the non-specific binding test tubes.	1 vial 5 mL	Black	Ready for use
[CAL] PP calibrator in phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide (<0.1%).	1 vial lyophilised	Yellow	Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label
[CONTROL] N Control - N = 1 or 2 Lyophilised controls with two different levels of PP.	2 vials lyophilised	Silver	Add 1 mL distilled water

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. 11-13x55 mm disposable tubes, polystyrene
3. Pipettes with disposable tips: 100 μL and 500 μL
4. Pipettes : 1 mL, 5 mL and 10 mL
5. Measuring cylinders: 25 mL and 50 mL
6. Vortex mixer
7. Centrifuge, refrigerated giving a minimum of 1700 x g
8. Gamma counter
- 9.

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Anti-PP:** Reconstitute with 52 mL distilled water. Store at 2-8° C.
- B. **^{125}I -PP:** Reconstitute with 12.5 mL distilled water. Store at -18° C or lower if reused.
- C. **Double antibody-PEG:** Ready for use. Mix thoroughly before use. Store at 2-8° C.
- D. **Calibrator diluent:** Reconstitute with 10 mL distilled water. Store at -18° C or lower if reused.
- E. **PP-calibrator,** 2 000 pmol/L. Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. Store at -18° C or lower if reused. For preparation of PP-working calibrators, see radioimmunoassay procedure.
- F. **Assay buffer:** Ready to use. Store at 2-8° C.
- G. **Controls:** Reconstitute with 1 mL distilled water. Store at -18° C or lower if reused.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use. The water used for reconstitution of lyophilised reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the contents in a vial by gentle inversion and avoid foaming. The stability of the reagents is found on the labels of the vials. For lyophilised reagents the expiry dates are valid for the unreconstituted reagents. Reconstituted reagents are stable for 10 weeks (no longer than to the expiry date) stored correctly.

IX. SPECIMEN COLLECTION

Patients should be fasting 10 hours prior to sample collection. Vein blood is collected in tubes without additives. The sample is allowed to clot. The serum is separated by centrifugation at +4° C. The serum should be frozen within 4 hours and stored at -18° C or lower until assayed. Repeated thawing and freezing should be avoided.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Reconstitute the reagents as specified. Reagents should be brought to room temperature prior to use. Accuracy in all pipetting steps is essential. All tests (calibrators, controls and samples) should be performed in duplicate.

A complete assay includes:

Calibrators: 7 concentrations; 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 pmol/L.

Controls.

Samples.

Tubes for determination of the non-specific binding (NSB-tubes).

Tubes for determination of the total radioactivity added (TOT-tubes).

B. Procedure

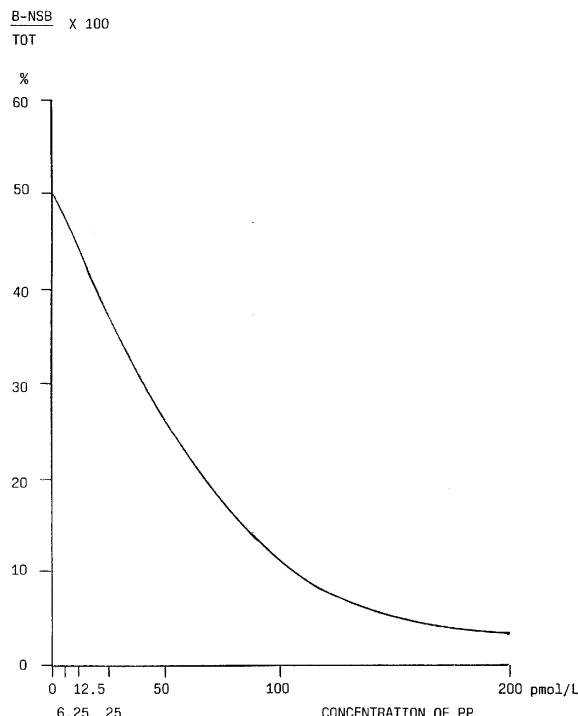
1. Reconstitute the reagents according to the instructions.
2. Prepare the PP-working calibrators by dilution of the PP-calibrator 2000 pmol/L with the calibrator diluent according to the following:
 a/ CAL 6 : 0.200 mL calibrator 2000 pmol/L + 1.800 mL diluent = 200 pmol/L
 b/ CAL 5 : 1.00 mL calibrator 200 pmol/L + 1.00 mL diluent = 100 pmol/L
 c/ CAL 4 : 1.00 mL calibrator 100 pmol/L + 1.00 mL diluent = 50 pmol/L
 d/ CAL 3 : 1.00 mL calibrator 50 pmol/L + 1.00 mL diluent = 25 pmol/L
 e/ CAL 2 : 1.00 mL calibrator 25 pmol/L + 1.00 mL diluent = 12.5 pmol/L
 f/ CAL 1 : 1.00 mL calibrator 12.5 pmol/L + 1.00 mL diluent= 6.25 pmol/L
 g/ Cal 0 : Calibrator diluent = 0 pmol/L
 Store the calibrator solutions at -18° C or lower if reused.
3. Pipette 100 μL of the calibrators (0-200 pmol/L), samples and controls in their respective tubes. Pipette 100 μL of the zero-calibrator in the NSB-tubes.
4. Pipette 500 μL antisera to all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
5. Add 500 μL assay buffer to the NSB-tubes.
6. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
7. Pipette 100 μL ^{125}I -PP to all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
8. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
9. Pipette 500 μL double antibody-PEG to all tubes except the TOT-tubes. Mix this reagent before pipetting.
10. Vortex-mix carefully and incubate for 30-60 minutes at 2-8° C.
11. Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4° C (minimum 1700 x g).
12. Decant the supernatants immediately after centrifugation.
13. Count the radioactivity of the precipitates in a gamma counter (counting time: 2-4 minutes).

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding tubes from the count rates (CPM) of the replicates of calibrators, controls and samples.
- A calibration curve is generated by plotting the precipitated CPM, bound fraction in CPM or % B/TOT against the concentrations of the PP-calibrators.
- Interpolate the PP concentrations of the samples and controls from the generated calibration curve.
- The calibration curve and the calculations of the concentrations in samples and controls can also be done by a computer method.

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

EXAMPLE OF PP STANDARD CURVE



XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Sensitivity

The lowest detectable concentration is 5 pmol/L. The figure corresponds to a decrease in binding of two \times SD of the bound radioactivity in the zero-concentration calibrator.

B. Precision

Intra assay variation

Level	Coefficient of variation (%CV)	N
12.9 pmol/L	3.2%	16
62.2 pmol/L	4.3%	18

Inter assay variation (total variation)

Level	Coefficient of variation (%CV)	N
12.5 pmol/L	16.4%	10
66.3 pmol/L	4.2%	10

C. Accuracy

A mean recovery of 98% was achieved when known amounts of hPP were added to human serum.

	Quantity added	Read value	Theoretical value	% Recovery
Sample 1		39.91		
Sample 1 + (10 pmol/L)	10	55.49	49.9	111%
Sample 1 + (20 pmol/L)	20	62.36	59.9	104%
Sample 1 + (50 pmol/L)	50	95.02	89.9	106%
Sample 1 + (100 pmol/L)	100	129.65	139.9	93%
Sample 2		37.76		
Sample 2 + (10 pmol/L)	10	42.91	47.8	90%
Sample 2 + (20 pmol/L)	20	44.09	57.8	76%
Sample 2 + (50 pmol/L)	50	91.28	87.8	104%
Sample 2 + (100 pmol/L)	100	137.65	137.8	100%

D. Specificity

The following cross reactions have been found:

Peptide	Cross-reaction
Pancreatic polypeptide, human	100.0 %
Pancreatic polypeptide, bovine	120 %
Gastric inhibitory peptide, porcine	0.02 %
Cholecystokinin 39, porcine	0.02 %
Secretin, porcine	0.02 %
Gastrin 34, human	<0.01 %
Gastrin 17, human	<0.01 %
Glucagon, human, porcine	0.03 %
Insulin, porcine	<0.01 %
ACTH 1-39, porcine	<0.003%
Neuropeptide Y, human	<0.8 %
Peptide YY, human	<1.0 %

E. Interference

Samples displaying cloudiness, hemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results.

F. Dilution

Sera with high analyte concentrations were tested at different dilutions.

Dilution	Expected (pmol/L)	Measured (pmol/L)	% Recovery
Serum 1	41.3		
	20.6	19.5	94%
	10.3	9.9	96%
Serum 2	144.67		
	72.3	71.4	99%
	36.2	37.6	104%
	18.1	19.7	109%

Samples were diluted with diluent buffer.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

In order to completely monitor the consistent performance of the radioimmunoassay, the following important factors must be checked.

1. Controls

The found concentrations of the controls should be within the limits given on the labels of the vials.

2. Total counts

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of ^{125}I -PP in this kit will give 10500 CPM (-5, +20%) at the activity reference date (counting efficiency = 80%).

3. Maximum binding (Bo/TOT)

Calculate for each assay the % bound radioactivity in the zero-calibrator:

$$\frac{\text{Bo}}{\text{TOT}} \times 100$$

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$$

The non-specific binding should be less than 7%.

5. Slope of calibration curve

For example, monitor the 80, 50 and 20% points of the calibration curve for run to run reproducibility.

XV. REFERENCE INTERVALS

Normal level of PP in human serum : <100 pmol/L (fasting level obtained with this procedure).

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

As the regulations may vary from one country to another, it is essential that the persons responsible for the laboratory are familiar with current local regulations, concerning all aspects of radioactive materials of the type and quantity used in this test.

This kit contains components of human origin. They have been tested by immunoassay for hepatitis B surface antigen, antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2 and found to be negative. Nevertheless, all recommended precautions for the handling of blood derivatives, should be observed.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. Steps should be taken to ensure the proper handling of the radioactive material, according to local and/or national regulations. Only authorized personnel should have access to the reagents.

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

- Radioactive material should be stored in specially designated areas, not normally accessible to unauthorized personnel.
- Handling of radioactive material should be conducted in authorized areas only.
- Care should be exercised to prevent ingestion and contact with the skin and clothing. Do not pipette radioactive solutions by mouth.
- Drinking, eating or smoking should be prohibited where radioactive material is being used.
- Hands should be protected by gloves and washed after using radioactive materials.
- Work should be carried out on a surface covered by disposable absorbing material.
- Spills of radioactive material should be removed immediately, and all contaminated materials disposed as radioactive waste. Contaminated surfaces should be cleaned with a detergent.

The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead drain pipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be rinsed thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S.
Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product.
J Biol Chem 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L.
Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas.
J Histo Chem Society 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H.
Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas.
Diabetes 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C.
Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP).
In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds).
Methods of hormone radioimmunoassay.
Academic Press, New York, 1979, 657-672.

5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G.

Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.
J Biol Chem 250:9369-9376, 1975.

6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A.
Distribution and release of human pancreatic polypeptide.
Gut 17:940-944, 1976.

7. Hazelwood, R.L.

Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates.
In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds).
The islets of Langerhans, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.

8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R.
Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma.
Regulatory Peptides 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of pancreatic polypeptide.
Am J Surgery 151:130-140, 1986.

10. Seymour, N.E., Brunicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E.,
Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K.
Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic polypeptide administration in man.
Surgery 104:119-129, 1988.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibrator 0	-	100 μL	-	-	-
Calibrators	-	-	100 μL	-	-
Controls	-	-	-	100 μL	-
Samples	-	-	-	-	100 μL
Antiserum	-	-			500 μL
Assay buffer	-	500 μL	-	-	-
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C					
^{125}I Tracer					100 μL
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C					
Double antibody PEG	-				500 μL
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 2-8°C					
Centrifuge 15 min (1700 g at 4°C)					
Decant and count the radioactivity of the precipitates					

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



it

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

PP-RIA

I. DESTINAZIONE D'USO

Dosaggio radioimmunologico per la misurazione quantitativa *in vitro* di polipeptidi pancreatici (PP) nel siero umano.

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. Nome brevettato : DIAsource PP-RIA
- B. Numero di catalogo : RB316 : 100 test
- C. Fabbricato da : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Per assistenza tecnica o per informazioni sull'ordinazione, contattare:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. RETROSCENA CLINICO

1. Attività biologiche

Il polipeptide pancreatico (PP) è sintetizzato come porzione amino-terminale di un peptide precursore. PP isolato dal pancreas ha 36 residui di amminoacidi con tirosina amidata C-terminale. PP è secreto dalle cellule F delle isole di Langerhans. PP è localizzato quasi interamente nel pancreas sebbene siano stati registrati livelli percepibili lungo il tratto gastrointestinale. PP nel plasma umano è registrato in almeno quattro forme diverse: PP 1-36, PP 3-36 e due forme non identificate.

PP è rilasciato nel plasma durante la stimolazione del pasto. Il ruolo fisiologico di PP comprende l'inibizione delle secrezioni esocrine stimolate gastriche e pancreatiche e l'aumento della produzione di glucosio epatico inibita da insulina. Queste azioni di PP sono mediate da recettori specifici. Gli studi sui recettori leganti hanno dimostrato che l'amido della tirosina intatto C-terminale è necessario per l'attività biologica.

2. Applicazione clinica

La secrezione di PP è stimolata dai pasti, soprattutto da proteine e grasso. PP è anche prodotto dai tumori endocrine active tumours nel pancreas e nel tratto gastrointestinale. Questi tumori spesso producono diversi ormoni peptidi nelle combinazioni PP-VIP, PP-glucagone o PP-gastrina. Sono stati riscontrati anche tumori soltanto con secrezione PP. Questi tumori possono comparire con WDHA o la sindrome di Verner-Morrison. Elevati livelli di digiuno di PP nel siero si riscontrano all'occorrenza di tumori producenti PP e tumori endocrini nel pancreas e nel tratto gastrointestinale.

IV. PRINCIPI DEL METODO

L'uso previsto dei reagenti è per testare PP nel siero umano. PP nel siero è analizzato senza estrazione da un dosaggio radioimmunologico competitivo con un antisiero di coniglio contro PP bovino. PP nei calibratori e campioni compete con PP umano ^{125}I nel legarsi agli anticorpi. ^{125}I -PP si lega in proporzione inversa alla concentrazione di PP nei calibratori e campioni. ^{125}I -PP legato agli anticorpi viene separato dalla frazione non legata con la tecnica di precipitazione doppio anticorpo in glicole polietileno. Viene misurata la radioattività della precipitazione. PP umano sintetico è usato per la standardizzazione.

Per uso professionale in laboratorio.

V. REAGENTI FORNITI

Reagenti	Kit per 100 test	Codice colore	Ricostruzione
[ANTISERUM] Antisiero di coniglio contro PP bovino. Contiene tampone fosfato con albumina di siero umano e NaN ₃ .	1 fiala liofilizzato	Blu	Aggiungere 52 mL di acqua distillata
Ag ^{125}I TRACCIANTE: PP ^{125}I odio in tampone fosfato con albumina di siero umano e NaN ₃ . Contiene normale siero di coniglio	1 fiala liofilizzato 28 kBq	Rosso	Aggiungere 12.5 mL di acqua distillata
[Ab PEG] PEG doppio anticorpo: Antisiero di capra anti-coniglio in tampone fosfato con albumina di siero umano e azoturo di sodio. (<0.1%). Contiene glicole polietileno	1 fiala 50 mL	Verde	Pronto all'uso
[DIL BUF] Diluente calibratore: Siero umano privo di PP liofilizzato. Contiene aprotinina. Per la preparazione di calibratori funzionanti per PP.	1 fiala liofilizzato	Nero	Aggiungere 10 mL di acqua distillata
[ASS BUF] Tampone del test : tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%). Da utilizzare in luogo dell'antisiero nei tubi del test con legame non specifico.	1 fiala 5 mL	Nero	Pronto all'uso
[CAL] Calibratore PP in tampone fosfato contenente albumina di siero umano e azoturo di sodio, (<0.1%).	1 fiala liofilizzato	Giallo	Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala
[CONTROL N] Controllo - N = 1 o 2 Controlli liofilizzati con due diversi livelli di PP.	2 fiale liofilizzato	Argento	Aggiungere 1 mL di acqua distillata

VI. NON IN DOTAZIONE

Il seguente materiale è necessario ma non fornito con il kit:

1. Acqua distillata
2. Tubi usa e getta in polietilene 11-13x55 mm
3. Pipette con punte usa e getta: 100 e 500 μL
4. Pipette: 1 mL, 5 mL e 10 mL
5. Cilindri di misura: 25 mL e 50 mL
6. Agitatore a vortice
7. Centrifugare, refrigerati con minimo 1700 x g
8. Contatore Gamma

VII. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

- A. **Anti-PP:** Ricostituire con 52 mL di acqua distillata. Conservare a 2-8° C.
- B. **^{125}I -PP:** Ricostituire con 12.5 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- C. **PEG doppio anticorpo:** Pronto all'uso. Miscelare accuratamente prima dell'uso. Conservare a 2-8° C.
- D. **Diluente calibratore:** Ricostituire con 10 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- E. **Calibratore PP:** Ricostituire con acqua distillata per il volume indicato sull'etichetta della fiala. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato. Per la preparazione di calibratori funzionanti con PP, v. la procedura di dosaggio radioimmunologico.
- F. **Tampone test:** Pronto all'uso. Conservare a 2-8° C.
- G. **Controlli:** Ricostituire con 1 mL di acqua distillata. Conservare a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.

VIII. CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8° C prima della ricostituzione e dell'uso. L'acqua usata per ricostituire i reagenti liofilizzati deve essere distillata in un apparecchio completamente in vetro oppure deve essere di purezza equivalente. Sciogliere i contenuti in una fiala girandola delicatamente evitando la formazione di schiuma. La stabilità dei reagenti è riportata sulle etichette delle fiale. Per i reagenti liofilizzati, la data di scadenza è valida per i reagenti non ricostituiti. I reagenti ricostituiti sono stabili per 10 settimane (non oltre la data di scadenza) se conservati correttamente.

IX. RACCOLTA DI CAMPIONI

I pazienti devono essere a digiuno da 10 ore prima di raccogliere il campione. Il sangue venoso viene raccolto in tubi senza additivi. Il campione viene lasciato coagulare.

Il siero viene separato tramite centrifugazione a +4°C. Il siero deve essere congelato entro 4 ore e conservato a -18° C o a temperatura inferiore fino all'analisi. Evitare congelamento e scongelamento ripetuti.

X. PROCEDURA

A. Note sulla manipolazione

Ricostituire i reagenti come specificato. I reagenti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. È essenziale eseguire il pipettaggio con precisione. Tutti i test (calibratori, controlli e campioni) devono essere eseguiti in duplicati.

Un test completo comprende:

Calibratori: 7 concentrazioni; 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 pmol/L.

Controlli.

Campioni.

Tubi per la determinazione del legame non specifico (tubi NSB).

Tubi per la determinazione della radioattività totale aggiunta (tubi TOT).

B. Procedura

1. Ricostituire i reagenti secondo le istruzioni.
2. Preparare i calibratori di lavoro PP diluendo 2000 pmol/L di calibratore PP con il diluente del calibratore secondo la seguente tabella:
 a/ CAL 6 : 0.200 mL calibratore 2000 pmol/L + 1.800 mL diluente = 200 pmol/L
 b/ CAL 5 : 1.00 mL calibratore 200 pmol/L + 1.00 mL diluente = 100 pmol/L
 c/ CAL 4 : 1.00 mL calibratore 100 pmol/L + 1.00 mL diluente = 50 pmol/L
 d/ CAL 3 : 1.00 mL calibratore 50 pmol/L + 1.00 mL diluente = 25 pmol/L
 e/ CAL 2 : 1.00 mL calibratore 25 pmol/L + 1.00 mL diluente = 12.5 pmol/L
 f/ CAL 1 : 1.00 mL calibratore 12.5 pmol/L + 1.00 mL diluente = 6.25 pmol/L
 g/ CAL 0 : diluente calibratore = 0 pmol/L.
 Conservare la soluzione del calibratore a -18° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
3. Pipettare 100 μL di calibratori (0-200 pmol/L), campioni e controlli nei tubi rispettivi. Pipettare 100 μL del calibratore zero nei tubi NSB.
4. Pipettare 500 μL di antisiero in tutti i tubi eccetto i tubi NSB e TOT.
5. Aggiungere 500 μL di tampone del test ai tubi NSB.
6. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8° C.
7. Pipettare 100 μL ^{125}I -PP in tutti i tubi. I tubi TOT sono sigillati e tenuti da parte.

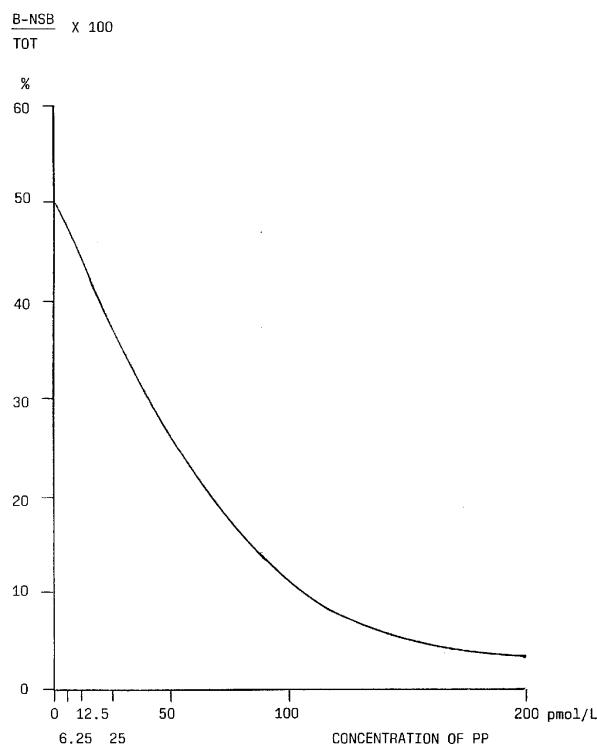
8. Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.
9. Pipettare 500 µL PEG doppio anticorpo in tutti i tubi eccetto i tubi TOT.
- Miscelare questo reagente prima del pipettaggio.
10. Miscelare nell'agitatore a vortice con prudenza e incubare per 30-60 minuti a 2-8°C.
11. Centrifugare i tubi per 15 minuti a +4°C (minimo 1700 x g).
12. Decantare i surnatanti subito dopo la centrifugazione.
13. Misurare la radioattività dei precipitati in un contatore gamma. (tempo di misurazione: 2-4 minuti).

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Sottrarre il conteggio medio (CPM) dei tubi leganti non specifici dal conteggio (CPM) dei replicati di calibratori, controlli e campioni.
2. Una curva di calibrazione viene generata tracciando il CPM precipitato, la frazione legata in CPM o %B/TOT rispetto alla concentrazione di calibratori PP.
3. Interpolare le concentrazioni di PP nei campioni e controlli dalla curva di calibrazione generata.
4. La curva di calibrazione e il calcolo delle concentrazioni in campioni e controlli può anche essere eseguita con metodo computerizzato.

I seguenti dati hanno esclusivamente scopo dimostrativo e non devono mai essere utilizzati in luogo dell'effettiva curva di calibrazione temporale.

EXAMPLE OF PP STANDARD CURVE



XIII. ESECUZIONE E LIMITI

A. Sensibilità

La concentrazione minima riscontrabile è 5 pmol/L. La cifra corrisponde ad una diminuzione nel legame di due x SD della radioattività legata nel calibratore a concentrazione zero.

B. Precisione

Variazione intra-test

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
12.9 pmol/L	3.2%	16
62.2 pmol/L	4.3%	18

Variazione inter-test (totale)

Livello	Coefficiente di variazione (%CV)	N
12.5 pmol/L	16.4%	10
66.3 pmol/L	4.2%	10

C. Precisione

Un recupero medio di 98% è stato raggiunto aggiungendo note quantità di hPP al siero umano.

	Quantità aggiunta	Leggi il valore	Valore teorico	% Recupero
Sample 1				
Sample 1 + (10 pmol/L)	10	55.49	49.9	111%
Sample 1 + (20 pmol/L)	20	62.36	59.9	104%
Sample 1 + (50 pmol/L)	50	95.02	89.9	106%
Sample 1 + (100 pmol/L)	100	129.65	139.9	93%
Sample 2				
Sample 2 + (10 pmol/L)	10	42.91	47.8	90%
Sample 2 + (20 pmol/L)	20	44.09	57.8	76%
Sample 2 + (50 pmol/L)	50	91.28	87.8	104%
Sample 2 + (100 pmol/L)	100	137.65	137.8	100%

D. Specificità

Sono state trovate le seguenti reazioni incrociate:

Peptide	Reazione incrociata
Polipeptide pancreatico, umano	100.0 %
Polipeptide pancreatico, bovino	120 %
Peptide inibitore gastrico, suino	0.02 %
Colecistochinina 39, suina	0.02 %
Secretina, suina	0.02 %
Gastrina 34, umana	<0.01 %
Gastrina 17, umana	<0.01 %
Glucagone, umano, suino	0.03 %
Insulina, suina	<0.01 %
ACTH 1-39, suina	<0.003%
Neuropeptide Y, umano	<0.8 %
Peptide YY, umano	<1.0 %

E. Interferenza

Campioni con torbidità, emolisi, iperlipemia o contenenti fibrina possono dare risultati imprecisi.

F. Diluizione

I sieri con elevate concentrazioni di analiti sono stati testati a diverse diluizioni.

Diluizione	Previsto (pmol/L)	Misurato (pmol/L)	% Recupero
Serum 1	41.27		
1/2	20.6	19.5	94%
1/4	10.3	9.9	96%
Serum 2	144.67		
1/2	72.3	71.4	99%
1/4	36.2	37.6	104%
1/8	18.1	19.7	109%

I campioni sono stati diluiti con tampone diluente.

XIV. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

Per monitorare completamente la prestazione coerente del dosaggio radioimmunologico, occorre verificare i seguenti importanti fattori.

1. Controlli

La concentrazione di controlli rilevata deve essere compresa nell'intervallo dato sulle etichette delle fiale.

2. Conteggi totali

I conteggi ottenuti dovrebbero avvicinarsi al CPM atteso CPM quando vengono regolati per l'efficienza del contatore e il decadimento radioattivo. Il contenuto di ^{125}I -PP in questo kit darà 10500 CPM (-5, +20%) alla data di riferimento dell'attività (efficienza del conteggio = 80%).

3. Legame massimo (Bo/TOT)

Calcolare per ogni test la % di radioattività legata nel calibratore zero:

$$\frac{\text{Bo}}{\text{TOT}} \times 100$$

TOT

4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Calcolare per ogni test la % di legame non specifico:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$$

TOT

Il legame non specifico deve essere inferiore a 7%.

5. Discesa della curva di calibrazione

Per esempio, monitorare i punti a 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per la riproducibilità interfase.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Livello normale di PP nel siero umano: <100 pmol/L (livello a digiuno ottenuto con questa procedura).

XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Esclusivamente per la diagnostica in vitro.

Dato che le norme potrebbero variare da Paese a Paese, è fondamentale che le persone responsabili del laboratorio acquisiscano dimestichezza con le norme locali in vigore relative a ogni aspetto dei materiali radioattivi del tipo e della quantità usati in questo test.

Questo kit contiene componenti di origine umana. Sono stati testati con il dosaggio immunologico per l'antigene superficiale dell'epatite B, anticorpi di HCV e anticorpi di HIV-1 e HIV-2 e trovati negativi. Ciononostante, vanno osservate tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione dei derivati del sangue.

Questo kit contiene ^{125}I (periodo di dimezzamento: 60 giorni), radiazioni emittenti ionizzanti X (28 keV) e γ (35.5 keV). Adottare misure volte a garantire la corretta manipolazione del materiale radioattivo secondo le norme locali e/o regionali.

Soltanto il personale autorizzato deve avere accesso ai reagenti.

Rispettare le seguenti precauzioni quando si maneggiano materiali radioattivi:

- Il materiale radioattivo deve essere conservato in aree appositamente designate, non normalmente accessibili a personale non autorizzato.
- La manipolazione del materiale radioattivo deve essere effettuata soltanto nelle aree autorizzate.
- Prestare attenzione a prevenire l'ingestione e il contatto con pelle e abbigliamento. Non pipettare soluzioni radioattive per bocca.
- Deve essere vietato bere, mangiare o fumare dove viene usato materiale radioattivo.
- Le mani vanno protette con guanti e lavate dopo aver utilizzato materiale radioattivo.
- Eseguire il lavoro su una superficie coperta da materiale assorbente usa e getta.

- Eliminare immediatamente eventuali fuoriuscite di materiale radioattivo e gettare tutti i materiali contaminati come rifiuti radioattivi. Le superfici contaminate vanno pulite con detergente.

I reagenti in questo kit contengono azoturo di sodio. Il contatto con tubi di scarico in rame o piombo potrebbe provocare l'accumulo di depositi di azoturo altamente esplosivi. Quando si gettano i reagenti nella rete fognaria, sciacquare sempre con abbondante acqua per prevenire la formazione di sali metallici. I tubi sospetti di contaminazione con questi depositi esplosivi vanno sciacquati abbondantemente con una soluzione al 10% di idrossido di sodio.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Schwartz, T.W., Gingerich, R.L. and Tager, H.S. Biosynthesis of pancreatic polypeptide: identification of precursor and cosynthesized product. *J Biol Chem* 225:11494-11498, 1980.
2. Greider, M.H., Gersell, D.J. and Gingerich, R.L. Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas. *J Histo Chem Society* 26:1103-1108, 1978.
3. Gersell, R.J., Gingerich, R.L. and Greider, M.H. Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in human and canine pancreas. *Diabetes* 28:11-15, 1979.
4. Chance, R.E., Moon, N.E. and Johnson, M.C. Human pancreatic polypeptide (HPP) and bovine pancreatic polypeptide (BPP). In B.M. Jaffe and H.R. Behlman (Eds). *Methods of hormone radioimmunoassay*. Academic Press, New York, 1979, 657-672.
5. Kimmel, J.R., Hayden, L.J. and Pollock, H.G. Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J Biol Chem* 250:9369-9376, 1975.
6. Adrian, R.E., Bloom, S.R., Bryant, M.G., Polak, J.M., Heitz, P.H. and Barnes, A. Distribution and release of human pancreatic polypeptide. *Gut* 17:940-944, 1976.
7. Hazelwood, R.L. Synthesis, storage, secretion and significance of pancreatic polypeptide in vertebrates. In S.J. Cooperstien and D. Watkins (Eds). *The islets of Langerhans*, Academic Press, New York, 1981, p.p. 275-283.
8. Gingerich, R.L., Akpan, J.O., Leith, K.M. and Gilbert, W.R. Patterns of immunoreactive pancreatic polypeptide in human plasma. *Regulatory Peptides* 33:275-285, 1991.
9. Sun, Y.S., Brunicardi, F.C., Duck, P., Walfisch, S., Berlin, S.A., Chance, R.E., Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K. Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of pancreatic polypeptide. *Am J Surgery* 151:130-140, 1986.
10. Seymour, N.E., Brunicardi, F.C., Chaiken, R.L., Lebovitz, H.E., Chance, R.E., Gingerich, R.L., Elahi, D. and Andersen, D.K. Reversal of abnormal glucose production after pancreatic resection by pancreatic polypeptide administration in man. *Surgery* 104:119-129, 1988.

	Conte ggio totale	NSB	Calibratori (0-6)	Controlli	Campion i				
Calibratore 0	-	100 µL	-	-	-				
Calibratori	-	-	100 µL	-	-				
Controlli	-	-	-	100 µL	-				
Campioni	-	-	-	-	100 µL				
Antisiero	-	-	500 µL						
Tampone test	-	500 µL	-	-	-				
Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 20-24 ore a 2-8°C									
Tracciatore ¹²⁵ I	100 µL								
Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 20-24 ore a 2-8°C									
Doppio anticorpo PEG	-	500 µL							
Miscelare nell'agitatore a vortice e lasciare incubare per 30-60 min. a 2-8°C									
Centrifugare 15 min (1700 g at 4°C)									
Decantare e misurare la radioattività del precipitato									